

Acta Bot. Croat. 29 (1970) 33—38

VERÄNDERUNGEN IM CHROMATOPHOREN- FEINBAU VON *NETRIUM DIGITUS* (*DESMIDIACEAE*) BEI LICHTABSCHLUSS

With Summary in English and Croatian
Sa sadržajem na engleskom i hrvatskom jeziku

ELENA MARČENKO

(Institut »Ruđer Bošković«)

Received January 15th 1970.

Einleitung

Während das Lamellensystem der Chloroplasten bei höheren Pflanzen in Grana- und Intergranabereiche differenziert ist, ist bei den meisten Algen das Stroma der Chloroplasten von gleichartig ausgebildeten Thylakoiden durchzogen. Bei den Conjugaten dagegen konnten neben den nichtdifferenzierten Thylakoiden bei verschiedenen physiologischen Umständen auch granaähnliche Bildungen beobachtet werden. Bei *Micrasterias papillifera* (Chardard und Rouiller 1957), *Micrasterias truncata* (Marčenko, unveröffentlicht), *Mougeotia* (Kaja 1966), *Zygnema* (Chardard 1967), *Mesotaenium* und *Penium* (Chardard 1964) kommt spontan eine Granastruktur vor; bei *Micrasterias rotata* (Drawert und Mix 1961) ist die Chloroplastenstruktur dagegen vom physiologischen Zustand der Zelle abhängig.

Unter Umständen konnte man auch bei einigen anderen Algen aus dem Stamm der *Chlorophyta* eine Granastruktur, nämlich die s. g. »Pseudograna« beobachten; so z. B. bei *Carteria* (*Volvocales*, Lembi und Lang 1965), *Protosiphon botryoides* (*Chlorococcales*, Berkaloﬀ 1967), bei Verdunkelung der Zellen von *Acetabularia* (*Dasycladales*, Werz 1966) und bei autotrophen Zellen von *Chlamydothrys* (*Volvocales*, Wiesner und Amelunxen 1969).

Bei der *Desmidiaceae* *Netrium digitus* wurde die Granastruktur lichtmikroskopisch von Kopetzky-Rechtperg (1955) beschrieben, die besonders bei Verdunkelung von Zellen deutlich zum Vorschein kommt.

Diese Befunde wurden durch eigene Versuche bestätigt. Deshalb erschien es interessant zu sein die Chloroplastenstruktur von *Netrium* auch elektronenoptisch zu untersuchen.

Material und Methoden

Die Algen wurden in der Lösung von Pringsheim (1954), wie bereits früher beschrieben (Marčenko 1966), kultiviert.

Mitochondrienfärbungen wurden mit Visbagrün (1:50.000 in Nährlösung verdünnt, 2 Std) durchgeführt.

Das Chlorophyll wurde nach der Methode von Arnon (1949, in Holden 1965) mit Hilfe eines Spektrophotometers »Specol« bestimmt.

Als Beweis für die Vitalität der Zellen nach den Verdunklungsperioden diente das Vorkommen der Cytoplasmaströmung.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden lebende Algen (sowohl die belichtete Kontrolle als auch die dunkelgehaltenen Zellen) bei niederen Umdrehungszahl (1000 U/Min) zentrifugiert und teilweise in 2%-igen Agar eingebettet. Die Fixierung des Materials (teils in Agarblöckchen eingebetteter, teils nicht eingebetteter Zellen) erfolgte in 1%-iger Lösung von OsO_4 mit Na-Veronal Puffer (pH 7,2; 2, Std), oder in 4%-iger Lösung von Glutaraldehyd mit Cacodylatpuffer (pH 7,2; 30 Min.) und darauffolgender Postfixierung mit 1%-igen OsO_4 (2 Std). Der Entwässerung mit Ethanol folgte die Einbettung in Araldit. Fixierung und Entwässerung wurden bei ca 1°C ausgeführt. Die Schnitte wurden mit Bleicitrat nach Reynolds (1963) kontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens Elmiskop I des Institutes für Biologie der Universität Zagreb hergestellt.

Ergebnisse und Diskussion

a) Lichtmikroskopische Befunde

In der Zelle der verwendeten *Netrium*-Kulturen kann man zwei Chromatophore beobachten die aus einem axialen Cylinder und sieben sternartig ausgehenden Rippen bestehen (Abb. 1). Die vorgefundene Zahl der Rippen (7) ist in Übereinstimmung mit den Angaben von Biebel (1964) und West & West (1904) für *Netrium digitus*. Kopetzky-Rechtperg (1955) gibt für seinen Stamm jedoch an, dass die Chloroplasten mit neun Rippen versehen waren. Der Rand jeder Rippe ist gelappt und die Lappen abwechselnd zu beiden Seiten abgebogen. Nur ein dünner Cytoplasmabelag trennt die Chloroplasten von der Zellwand.

Nach Verdunkelung der Zellen (über zwei Wochen) kommt es zu Veränderungen, die z. Teil von Kopetzky-Rechtperg (1955) ausführlich beschrieben wurden. Hauptsächlich handelt es sich um eine Kontraktion und ein Zurückziehen der beiden Chloroplasten von der Zellwand — besonders im Gebiet der Pole und der Zellmitte (Abb. 2, 3 und 4). Dabei nimmt das Chloroplastenvolumen ab, die Reservesubstanzen werden abgebaut, die Zahl der charakteristischen Plasmastränge wird vermindert und es kommt zu einer unregelmässigen Vernetzung der durch Zerklüftung entstandener kleineren Stränge, die oft pendelnde Bewegung zeigen. Diese Plasmastränge sind sehr wahrscheinlich im engen Zusammenhang mit den Mitochondrien, da in ihnen nach Behandlung mit Visbagrün eine blaue körnerartige Färbung sichtbar wird. Ob gan-

ze Stränge mit Mitochondrien identifiziert werden können, wie Dräwert (1961) dies vermutete, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, da man diese Stränge im elektronenmikroskopischen Bild nicht vom übrigen Plasma klar unterscheiden kann.

Nach einer Verdunkelung von mehr als 10 Tage wird in den Chloroplasten lichtmikroskopisch eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte granaartige Struktur sichtbar, die besonders um das zentrale Pyrenoid sowie in älteren Zellen sichtbar wird (Abb. 3). Es tritt dann langsam ein Absterben der Zellen ein. Der Chlorophyllgehalt sinkt bei Lichtabschluss während der ersten 10 Tage in bezug auf die Kontrolle nicht. Weitere Messungen nach längeren Zeitabschnitten sind nicht verlässlich, da in diesem Fall ein Teil der Zellen bereits abgestorben war.

Nach etwa 4 Wochen Verdunkelung verlieren die Chloroplasten ihr typisches Aussehen und die Endlappen der Chloroplasten verschmelzen langsam zusammen (Abb. 2, 3 und 4). An der Peripherie der Chloroplasten werden in vielen Zellen homogene vakuolenartige Regionen sichtbar (Abb. 2), die im Fluoreszenzmikroskop keine Fluoreszenzerscheinungen und auch im Dunkelfeld keine Strukturierung erkennen lassen.

Erst nach einem Monat Verdunkelung konnte ein höheres Absterben der Zellen beobachtet werden. Von den noch nach einem Monat lebenden Zellen (Beweis: Plasmaströmung) waren aber bereits etwa 30% irreversibel geschädigt, was durch weitere Kulturversuche nachgewiesen werden konnte.

b) Elektronenmikroskopische Befunde

Die Feinstruktur der Chloroplasten der im Licht kultivierten Kontrolle zeigt im Stroma durchgehende Lamellenschichten, die aus meist je zwei parallel liegenden Thylakoiden bestehen. Die Thylakoide können einzeln oder in mehr oder weniger dichten (aufgeschichteten) Stapeln angeordnet sein (Abb. 5). Das Stroma ist mehr oder weniger stark ausgebildet. In sämtlichen Bildern (besonders nach OsO_4 Fixierung) sind die Lamellen der Thylakoide teilweise »aufgebläht«. Granaähnliche Strukturen (sonst üblich bei Conjugaten) konnten in der Kontrolle nur ausnahmsweise gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich in diesen Fällen um ältere Zellen.

Bei einem 10-tägigen (oder längeren) Lichtabschluss kann man in der Regel Partien mit ausgeprägter Granaausbildung (»Pseudograna« nach Lembi und Lang 1965, auch Berkaloﬀ 1967) vorfinden (Abb. 7 und 8). Oft kann man innerhalb der Thylakoide ein »blindes« Ende (Abb. 6 ↑) beobachten (auch in der belichteten Kontrolle), das durch eine Einfaltung der Thylakoidmembran entstanden ist, und als ein Teilungsstadium der Lamellenstruktur gedeutet wird (Kaja 1966, Berkaloﬀ 1967). Auch bei höheren Pflanzen wurden solche »Verschiebungen« der Chloroplastenmembranen als Entwicklungsstadien gedeutet (Wehrmeyer 1964). Ob es sich bei der Granabildung, die nach Verdunkelung der Zellen entsteht, um eine Neubildung der Granalamellen handelt, wie es bei der Verdunkelung der Zellen von *Acetabularia* von Werz (1966) angenommen wird, ist zur Zeit schwer zu sagen. Im Gegenteil erscheint es durchaus möglich, dass infolge der Chloroplastenschrumpfung, die offensichtlich durch einen Stromaschwund zustande kommt, die Thylakoide gewellt und gefaltet werden und auf diese Weise die Pseudograna bilden.

Das Verschwinden der Stärkehülle des Pyrenoids bei einigen verdunkelten Desmidiaceen neben einem kompakteren Bau des Pyrenoids wurde von Chardard und Rouiller (1957) elektronenmikroskopisch verfolgt. Nach etwa einem Monat Verdunkelung kann man bei *Netriumchloroplasten* ein Falten der Thylakoidstapeln beobachten. Neben einem teilweisen Abbau des Stroma sind weiterhin eine irreguläre Verteilung der Thylakoide und Grana im Stroma, wie auch eine Vergrößerung der Zahl und des Volumens der Plastoglobuli auffallend. Die an die Granalamellen grenzenden Plastoglobuli verschmelzen oft zu unregelmässigen, grossen osmiophilen Gebilden (»Fleck«, Abb. 7 ↑). In solchen Stadien sind die Zellen wahrscheinlich irreversibel geschädigt.

Ähnliche Vorgänge und Veränderungen wurden bei Verdunkelung der Chloroplasten höherer Pflanzen (Generozova 1965) sowie bei der Vergilbung der Blätter (Ljubešić 1968) beobachtet. Die bei den beiden Prozessen beschriebene Veränderungen zeigen folgende Reihenfolge: Abbau von Stromathylakoiden, »Zusammenpressen« von Grana-thylakoiden, ungeordnete Verteilung von Grana und Anhäufung der Plastoglobuli.

Zusammenfassung

Während in den belichteten Zellen von *Netrium digitus* die Chloroplasten vorwiegend ein undifferenziertes Thylakoidsystem besitzen, kommt bei mehr als 10 Tage dauernden Lichtabschluss vorwiegend eine granaähnliche Struktur zum Vorschein. Nach etwa 4 Wochen Verdunkelung treten dagegen irreversible Veränderungen ein, die ein Absterben der Zellen zur Folge haben.

Herrn Prof. Dr. Zvonimir Devidé danke ich herzlichst für seine Unterstützung bei der Arbeit.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bin ich Frau Dr. Mercedes Wrischer zu Dank verpflichtet.

Frau Branka Vrhovec danke ich bestens für ihre Mithilfe bei der Anfertigung der Ultradünnschnitten.

Tafelerklärung

- Abb. 1. *Netrium digitus*, belichtete Kontrolle, lebend. 600 : 1.
- Abb. 2. *N. digitus*, nach 4 Wochen Verdunkelung, lebend; vakuolenartiges Gebilde (↑); 800 : 1.
- Abb. 3. *N. digitus*, nach 4 Wochen Verdunkelung, lebend; granaartige Struktur sichtbar; 800 : 1.
- Abb. 4. *N. digitus*, nach 4 Wochen Verdunkelung; 460 : 1.
- Abb. 5. Kontrolle Chloroplastenstruktur. Fixierung OsO_4 ; 32.000 : 1.
- Abb. 6. Chloroplast, nach 8 Tage Verdunkelung; Fixierung: Glutaraldehyd/ OsO_4 ; 45.000 : 1.
- Abb. 7 und 8. Chloroplastenstruktur nach 4 Wochen Verdunkelung mit Pseudogranabildung. Fixierung: Glutaraldehyd/ OsO_4 ; osmiophiles Gebilde (↑). Abb. 7. 45.000 : 1; Abb. 8. 56.000 : 1.

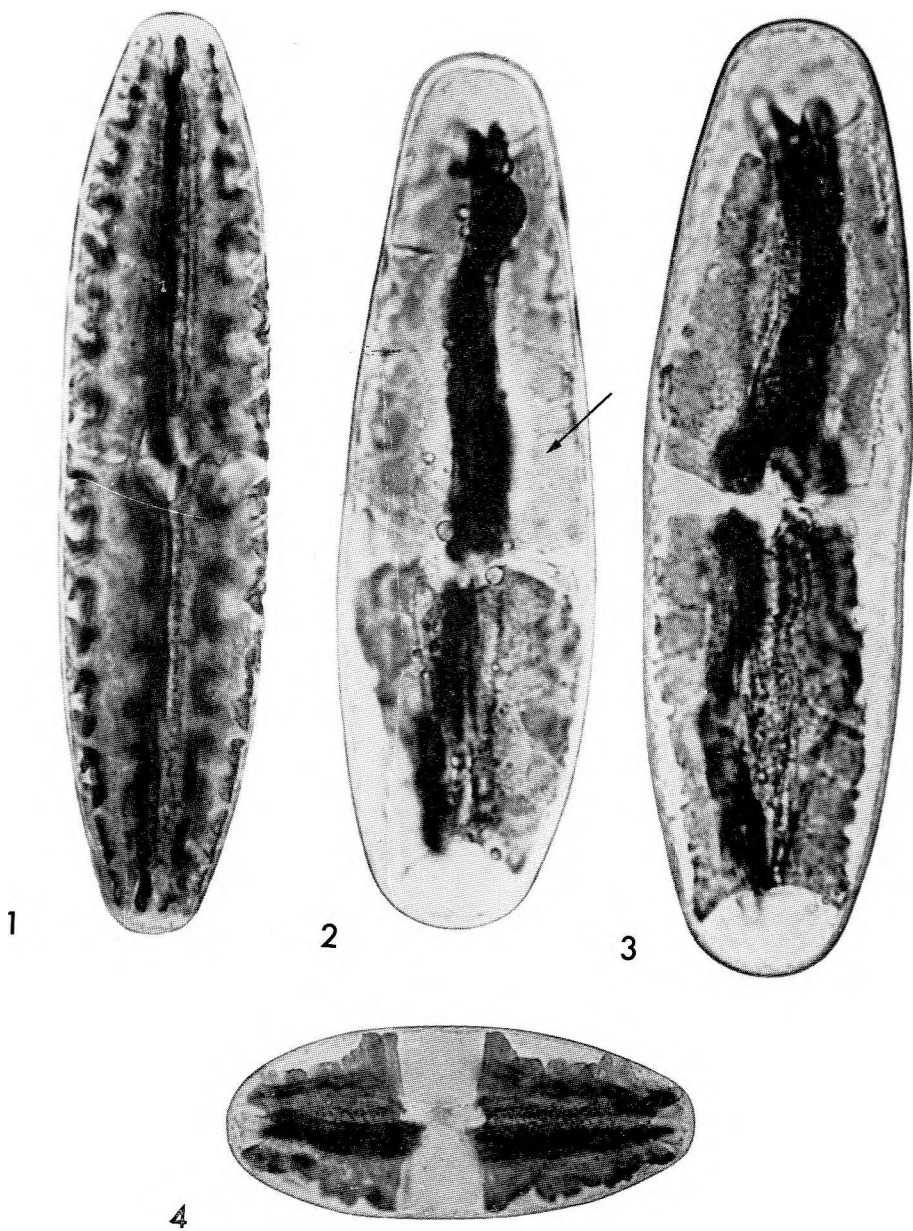


Abb. 1—4.

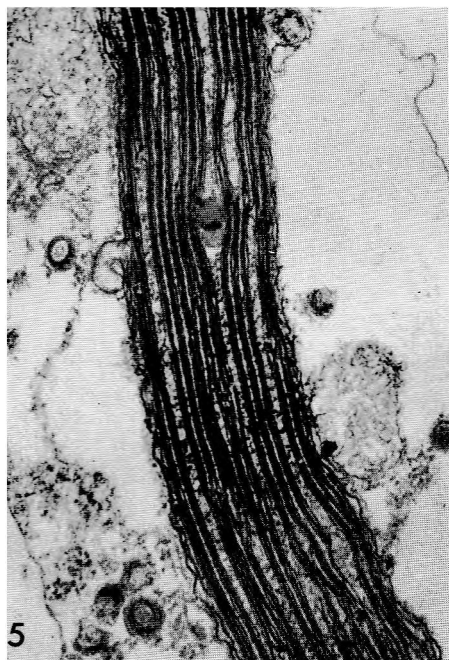


Abb. 5—8.

Schrifttum

- Berkaloff, C., 1967: Modifications ultrastructurales du piaste et de divers autres organites cellulaires au cours du développement et de l'enkystement du *Protosiphon botryoïdes* (Chlorophycées). J. Microsc. 6, 839—852.
- Biebel, P., 1964: The Sexual Cycle of *Netrium digitus*. Am. J. Bot. 51, 697—704.
- Chardard, R., 1964: Étude de l'ultrastructure de deux Algues zygomycées: *Mesotaenium caldariorum* et *Penium margaritaceum*. Rev. Cytol. Biol. Vég. 27, 77—93.
- Chardard, R., 1967: Étude au microscope électronique d'une Algue verte filamenteuse: *Zygnema* sp. Rev. Cytol. Biol. Vég. 30, 191—206.
- Chardard, R. und C. Rouiller, 1957: L'ultrastructure de trois Algues Desmidiées. Étude au microscope électronique. Rev. Cytol. Biol. Vég. 18, 153—175.
- Drawert, H. und M. Mix, 1961: Über die Variabilität der Chloroplastenstruktur bei *Micrasterias rotata*. Planta 56, 648—665.
- Drawert, H. und M. Mix, 1961: Der Einfluss von Antibiotica auf die Chloroplastenstruktur bei *Micrasterias rotata*. Planta 57, 51—70.
- Drawert, H. und M. Mix, 1961: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. VIII Mitteilung: Die Chondriosomen von *Micrasterias rotata*. Flora 151, 487—508.
- Generozova, I. P., 1965: Ul'trastruktura khloroplastov, Atlas Izd. Nauka, Moskva. p. 15—16.
- Holden, M., 1965: Chlorophylls. In: Goodwin, T. W. (Ed.), Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, London and New York. 461—488.
- Kaja, H., 1966: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Feinbau der Chromatophoren von *Mougeotia* spec. Z. Naturforsch. 21 b, 379—384.
- Kaja, H., 1967: Untersuchungen zur Entwicklung des Lamellarsystems von Algenchromatophoren. Ber. deut. bot. Ges. 78, 377—379.
- Kopetzky-Rechtperg, O., 1955: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge *Netrium digitus* (Ehrenberg) bei Kultur unter Lichtabschluss. Protoplasma 44, 322—331.
- Lembi, C. A. und N. J. Lang, 1965: Electron Microscopy of *Carteria* and *Chlamydomonas*. Am. J. Bot. 52, 464—477.
- Ljubešić, N., 1968: Feinbau der Chloroplasten während der Vergilbung und Wiederergrünung der Blätter. Protoplasma 66, 369—379.
- Marčenko, E., 1966: Über die Wirkung der Gammastrahlen auf Algen (Desmidiaceen). Protoplasma 62, 157—183.
- Pringsheim, E. G., 1954: Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Reynolds, E. S., 1963: The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron-Opaque Stain in Electron Microscopy. J. Cell Biol. 17, 208—213.
- Wehrmeyer, W., 1963: Über Membranbildungsprozesse im Chloroplasten. I. Mitteilung. Zur Morphogenese der Granamembranen. Planta 59, 280—295.
- Wehrmeyer, W., 1964: Über Membranbildungsprozesse im Chloroplasten. II. Mitteilung. Zur Entstehung der Grana durch Membranüberschiebung. Planta 63, 13—30.
- Werz, G., 1966: Morphologische Veränderungen in Chloroplasten und Mitochondrien von verdunkelten *Acetabularia*-Zellen. Planta 68, 256—268.
- West, W. und G. S. West, 1904: A Monograph of the British Desmidiaceae. Vol I, Ray Soc., London.
- Wiessner, W. und F. Amelunxen, 1969: Beziehungen zwischen submikroskopischer Chloroplastenstruktur und Art der Kohlenstoffquelle unter phototrophen Ernährungsbedingungen bei *Chlamydomonas stellata*. Arch. Mikrobiol. 66, 14—24.

SUMMARY

CHANGES IN THE CHLOROPLAST-ULTRASTRUCTURE OF *NETRIUM DIGITUS* (*DESMIDIACEAE*) AFTER A PERIOD OF DARKNESS

Elena Marčenko

(Institut »Ruđer Bošković«)

In illuminated cells of *Netrium digitus* the majority of the chloroplasts contains a more or less undifferentiated thylakoid system. After periods of darkness (of ten days and more) a predominant grana-like structure (»pseudograna«) appears in the chloroplasts.

SADRŽAJ

PROMJENE U ULTRASTRUKTURI KOROPLASTA VRSTE *NETRIUM DIGITUS* (*DESMIDIACEAE*) NAKON PERIODA TAME

Elena Marčenko

(Institut »Ruđer Bošković«)

U osvijetljenim stanicama vrste *Netrium digitus* većina kloroplasta sadrži manje-više nediferencirani sistem tilakoida. Nakon perioda tame (10 dana ili više) u kloroplastima javljaju se pretežno strukture slične grana-područjima (»pseudograna«).

Dr Elena Marčenko
Institut »Ruđer Bošković«
Bijenička 54
Zagreb (Jugoslavija)